

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公開特許公報(A) 平3-290184

⑬ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)12月19日

C 12 N 5/10

15/12

ZNA

6807-4B

7236-4B

8717-4B

C 12 N 5/00

15/00

B

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全9頁)

⑮ 発明の名称 スカベンジャーレセプター産生動物細胞

⑯ 特 願 平2-90274

⑰ 出 願 平2(1990)4月6日

⑱ 発 明 者 松 本 明 世 東京都新宿区早稲田鶴巻町570番地

⑲ 発 明 者 児 玉 龍 彦 東京都品川区上大崎2-13-22-909

⑳ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

スカベンジャーレセプター産生動物細胞

2. 特許請求の範囲

1. 動物細胞中で機能し得るプロモーターの制御下にヒトスカベンジャーレセプターⅠ型又はⅡ型をコードする遺伝子を含んで成るベクターにより形質転換された、ヒトスカベンジャーレセプターⅠ型又はⅡ型を発現することができる動物細胞。

2. 前記ヒトスカベンジャーレセプターⅠ型又はⅡ型をコードする遺伝子が第1図又は第2図に示す塩基配列中のコード領域の塩基配列を有する請求項1に記載の動物細胞。

3. 前記プロモーターがサイトメガロウイルスのプロモーターである請求項1に記載の動物細胞。

4. 前記動物細胞がチャイニーズハムスターオバリー細胞である請求項1に記載の動物細胞。

5. サイトメガロウイルスのプロモーターの下流に第1図又は第2図に示す塩基配列中のコード領域を含むcDNA断片が挿入されたベクターにより

形質転換されたチャイニーズハムスターオバリー細胞である請求項1に記載の動物細胞。

6. 請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞を培養することを特徴とするヒトスカベンジャーレセプターの製造方法。

7. 請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞を用いる血中変性リポ蛋白質又は変性物の検出方法。

8. ヒトスカベンジャーレセプターⅡ型をコードする遺伝子。

9. 第2図に示すコード領域の塩基配列を有する請求項8に記載の遺伝子。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はヒトスカベンジャーレセプターⅠ型又はⅡ型を発現することができる動物細胞及び該細胞を用いるヒトスカベンジャーレセプターⅠ型又はⅡ型の製造方法に関する。

〔従来の技術〕

動脈硬化は、コレステロールとリポ蛋白質との複合体である低比重リポ蛋白質(LDL)の変性体を取り込んだマクロファージが泡沫細胞に変化して血管内表細胞下に蓄積することにより惹起されると考えられている。スカベンジャーレセプターはマクロファージの細胞膜に存在し、変性したLDLと結合してそれを細胞内に取込む際に機能する蛋白質である。更にスカベンジャー受容体は、生体内で種々の変性物、ウイルス等の異物、エンドトキシンなどの生理活性物質の除去に関与している。従って、スカベンジャーレセプターの構造及び作用機作を解明することは動脈硬化の発症機構を解明し、さらにその診断、予防及び治療法、並びにそれらのための試薬や医薬を開発するために重要であると考えられる。また、マクロファージ及び網内系の機能の解明に重要である。

T. Kodamaら(Nature, 343: 532-535, 1990; 及び Nature, 343: 570-572, 1990)によりウシスカベンジャーレセプターの遺伝子がクローニングされ、

(3)

法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

上記の課題は、ヒトスカベンジャーレセプターを発現する細胞から該レセプターをコードする遺伝子を得、これを動物細胞中で機能し得るプロモーターの制御下に連結することによりベクターを作製し、このベクターにより動物細胞を形質転換し、そして安定に多量のヒトスカベンジャーレセプターを発現することができる細胞を選択することにより達成される。

〔具体的な説明〕

ヒト白血病細胞系 THP-1をPMAの存在下で培養することによりマクロファージ様細胞が得られ、この細胞から抽出されたmRNAがウシスカベンジャーレセプターcDNA断片とハイブリダイズすることが知られている。従って、この様にして得られたマクロファージ様細胞からmRNAを抽出し、次にこのmRNAに基づいてcDNAライブラリーを作製すること

その塩基配列からレセプターのアミノ酸配列が推定され、さらにその構造が推定された。それによればウシスカベンジャーレセプターにはI型及びII型が存在し、II型はI型のC-末端が短縮された構造を有し、いずれも三量体として存在する。

ヒト単核白血病細胞株 THP-1を200nMのホルボル12-ミリステート13-アセテート(PMA)の存在下で培養して分化させたマクロファージ様細胞から抽出されたPoly(A)⁺mRNAがウシスカベンジャーレセプターcDNA断片とハイブリダイズすることが知られている(T. Kodamaら、Nature, 343: 531-535, 1990)。しかしながら、ヒトスカベンジャーレセプター遺伝子のクローニング、及びクローニングされた遺伝子によりヒトスカベンジャーレセプターの発現については公表されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って、本発明は、ヒトスカベンジャーレセプターを発現することができる動物細胞及び該細胞を用いるヒトスカベンジャーレセプターの製造方

(4)

ができる。cDNAライブラリーの製作はmRNAからcDNAライブラリーを製作するために知られている任意の方法、例えばOkayama & Berg法、Gubler & Hoffman 法等により行うことができる。この様にして調製されたcDNAライブラリーは、例えばすでにクローニングされているウシスカベンジャーレセプターcDNAの任意の断片、又はウシスカベンジャーレセプターの推定されているアミノ酸配列に基づいて設計された合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、常法に従ってスクリーニングすることができる。あるいは、このようなプローブを用いて、又は前記のようにしてクローニングされたヒトスカベンジャーレセプターのcDNA断片を用いて、ヒトスカベンジャーレセプターを産生する細胞、例えば THP-1細胞から分化したマクロファージ様細胞からゲノムDNAを得ることもできる。

次に、この様にしてクローニングされたヒトスカベンジャーレセプター遺伝子を動物細胞中で機能し得るプロモーターの下流に連結して、該遺伝

(5)

(6)

子を動物細胞に導入するための形質転換ベクターを作製する。このためのベクターとしては、動物細胞中で機能し得る任意のベクターを使用することができ、例えばサイトメガロウイルスプロモーター、ジヒドロフォレート還元酵素プロモーター、WNLVプロモーター、メタロチオネインプロモーター等を使用することができる。形質転換ベクターはさらに、該ベクターにより形質転換された細胞を選択するための選択マーカー遺伝子を含有していることが望ましく、この様な選択マーカー遺伝子としては、例えばネオマイシン耐性遺伝子、

HGPRT遺伝子、DHFR遺伝子等を使用することができる。このベクターはさらに、動物細胞中で複製するための複製起点、大腸菌で遺伝子操作するための大腸菌複製起点及び大腸菌選択マーカー遺伝子をも含有することが望ましい。この様な形質転換ベクターを作製するための出発ベクターとしてR. / CMV (Introgen社から入手) を挙げることができる。このベクターはサイトメガロウイルスプロモーター、マルチクローニング部位、

CHpolyA、M13複製起点、SV40複製起点、ネオマイシン耐性遺伝子、polyA、pUC複製起点、アンピシリン耐性遺伝子をこの順序で含有する5.4 Kbpのシャトルベクターである。従って、この出発ベクターのマルチクローニング部位にヒトスカベンジャーレセプター遺伝子を挿入することにより、該遺伝子をサイトメガロウイルスの制御のもとに置くことができ、またこの出発ベクターから作製された形質転換ベクターにより形質転換された動物細胞はネオマイシン含有培地で培養することにより選択することができる。

出発ベクターにヒトスカベンジャーレセプター遺伝子を挿入して得た形質転換プラスミド(組換えプラスミド)は、大腸菌、例えばJM103に形質転換した後、アンピシリンにより選択し、さらに増幅することができる。次に、大腸菌から常法により、例えばCsCl超遠心法により精製する。

本発明においては、任意の動物細胞株を用いることができ、例えばチャイニーズハムスターオvary(CHO)細胞、COS細胞、HEPG2細胞、培養織

(7)

維芽細胞、培養血管内皮細胞、培養骨髄細胞等を用いることができる。

形質転換ベクターによる動物細胞の形質転換は常法に従って行うことができる。すなわち、動物細胞の培養に例えばウシ胎児血清(FBS) 7%を含有するF-12 Nutrient Mixture培地(Ham F-12; GIBCO)等を用いて行われる。形質転換は任意の常法に従って行うことができ、例えば陽イオンリポソーム介在形質転換法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417, 1987)、リン酸カルシウム法、electroporation法、レトロウイルスベクター法等により行うことができる。陽イオンリポソーム介在形質転換は、合成陽イオン脂質N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)を含有するリポソームと形質転換ベクターDNAとを混合して複合体を形成せしめ、これを動物細胞に添加することにより行われる。この形質転換は、例えばOpti-MEM Reduced Serum Medium (Opti-MEM; GIBCO)培地中で行われる。

(8)

形質転換処理が行われた動物細胞をスクリーニングすることにより実際に形質転換された細胞を選択する。この選択方法は形質転換ベクターに含まれる選択遺伝子の種類に依存する。例えば、形質転換ベクターがネオマイシン耐性遺伝子を含む場合にはネオマイシン含有培地で細胞のコロニーを形質せしめることによりネオマイシン耐性コロニーを選択することができる。

次に、形質転換された動物細胞集団中から、ヒトスカベンジャーレセプターを多く発現する細胞を選択する。スカベンジャーマクロファージは変性(例えば酸化)された低比重リポ蛋白質を取り込むが、変性体の実験モデルであるアセチル化低比重リポ蛋白質(AcLDL)をも取り込む。従って、形質転換された動物細胞に標識されたAcLDLを取り込ませ、そして多くの標識を担持する細胞を選択することによりスカベンジャーレセプターを多く発現する細胞を選択することができる。この場合、任意の標識を用いることができ、例えば1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テ

(9)

(10)

トラメチルーインドカルボシアニンペルクロリド(Dil)により標識した AcLDL(Dil-AcLDL)を用いる場合、Dil-AcLDLを取り込んだ細胞を蛍光顕微鏡により直接観察することができる。あるいは、コンパクチン(40 μ m)、メバロン酸(150~200 μ m)及びアセチルLDL(1~10 μ g/ml)を含む選択培地でスカベンジャーレセプターが存在する細胞のみが生き残るようにしてクローン化することができる。

こうして得られた発現細胞からヒトスカベンジャー受容体cDNAは次のようにして単離することができる。すなわち、ヒトスカベンジャー受容体発現細胞からのスカベンジャー受容体cDNAの単離は常法により発現細胞から核DNAを調製し、第1図又は第2図に示した塩基配列より適当なオリゴヌクレオチドプライマー(20塩基程度)を合成し、それらの組合せによって、polymerase chain reaction(PCR)を用いて目的とするヒトスカベンジャー受容体I型あるいはII型のcDNAを増幅、単離することができる。すなわち、発現細胞

(11)

た。得られたDNAのサイズは、I型1.8キロベース、II型は1.3キロベースである。

〔発明の効果〕

本発明のスカベンジャーレセプター発現細胞は、動脈硬化発症に関わるスカベンジャーレセプター経路について、この経路から細胞へ取り込まれる修飾されたLDL(リガンド)の特異性を解析するために用いることができる。また、物質の受容体を介した細胞への取り込み(endocytosis)解析のためのモデルとして有用である。さらに、本発明の細胞は動脈硬化症の治療薬、例えばLDL変性の抑制剤、アシルCo-Aコレステロールアシルトランスフェラーゼ(ACAT)活性阻害剤などの開発過程における薬剤のスクリーニングに用いることができる。また、細胞内のあるヒトスカベンジャーレセプター蛋白の製造に用いることができる。また、スカベンジャーレセプターを介する異物もしくは変性物の処理の過程の実験系、又は変性アルブミンに伴って感染をおこすB型肝炎ウイルスなどの

(13)

I型あるいはII型を ϕ 100nmのディッシュで3日間培養し、トリプシン処理で細胞を回収する(〜 1×10^7 個)。細胞をPBS(phosphate buffered saline)で洗浄後、50 μ g/mlプロテイナーゼKを含有する0.5%SDS、10mMEDTA、15mMNaCl、10mMトリス緩衝液の1mlに懸濁し、65℃で1時間インキュベート後、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって核DNAを調製する。スカベンジャー受容体cDNAのPCRプライマーとして1) 5'-GAGAAGTGGATAAATCAGTG-3'、2) 5'-ACAATATGTGTGGATTGGAG-3' および 3) 5'-GTAATTGGAGTAAAGAAGAGG-3'を合成し、I型にはプライマー1)と2)の組合せ、II型にはプライマー1)と3)の組合せで、目的とするcDNA断片を増幅することができる。PCRは100 μ lの反応系に各プライマー1 μ M、核DNA 1 μ g、Taq polymerase 2.5単位とし、95℃1分、54℃1分、72℃3分のサイクルを30回繰り返した。増幅されたDNA断片は0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルから常法により回収し

(12)

感染実験系として用いることができる。

実施例1. ヒトスカベンジャーレセプターcDNAの

クローン化

ヒト単核白血球細胞系 THP-1を10%のウシ胎児血清を含有するRPMI1640培地に培養した。THP細胞を200nMのホルボール 12-ミリスチレート 13-アセテート(PMA)の存在下で4日間培養することによりマクロファージ様細胞に分化せしめた。この細胞から、Chomczynski(Anal. Biochem. 162: 156, 1987)の方法に従って、チオシアン酸グアニジン/フェノール/クロロホルム抽出により poly(A)⁺mRNAを単離した。6 μ gのmRNAと5 μ gのランダムヘキサヌクレオチドを用いて、Gubler及びHoffman(Gene, 25: 263, 1983)の方法に従って二本鎖cDNAを合成した。このcDNAをEcoRIアダプターに連結し、そして5~20%酢酸カリウム勾配において、SW60ローター(Beckman Instruments)中で50,000rpmにて3時間遠心分離することによりサイズ分画した。こうして、約800塩基対(アガロースゲル電気泳動による)以上の分子量を有

(14)

するcDNA断片を得、これをEcoRIにより消化したλZAP II (Stratageneより入手) ベクターに連結し、パッケージし、そしてXL-1 Blue細胞(Stratageneより入手) に感染させた。cDNAを含有するλZAP IIを増幅してcDNAライブラリーを得た。

ウシスカベンジャーレセプターcDNAを含有するプラスミドpBSR 7 (T. Kodamaら、Nature, 343: 531-535, 1990) からのコラーゲン様ドメインに相当する354bpのXbaI-SphI断片を得、これを³²Pにより放射能ラベルしてハイブリダイゼーションプローブを調製した。

前記ヒトスカベンジャーレセプターcDNAライブラリーの5×10⁵ プラークを前記DNAプローブによりスクリーニングして2個の陽性クローンを得た。これをタイプI及びタイプIIと称する。これらの陽性クローンのcDNAの塩基配列をSangerのダイデオキシ法により決定した。これらはいずれも長い1個のオープンリーディングフレームを含み、それぞれウシスカベンジャーレセプターcDNAの塩基配列との相同性を示し、I型とII型の塩基

配列は3'-末端側において異っていた。これらの塩基配列を第1図(I型)及び第2図(II型)に示す。これらのクローンのcDNA部分をプローブとして用いてさらに6×10⁵ プラークのcDNAライブラリーをスクリーニングしたところI型のクローン14個及びII型のクローン3個を得た。I型及びII型の代表的クローンをそれぞれphSR I及びphSR IIとしその後の実験に使用した。

実施例2. ヒトスカベンジャーレセプター産生細胞の作製

前記のようにして得たプラスミドクローンphSR I及びphSR IIをそれぞれ次のようにして処理した。これらのプラスミドを制限酵素Hind III及びXba Iで消化し、翻訳開始コドンATGから翻訳終止コドンTAAまでの全体(I型: 451アミノ酸; II型: 358アミノ酸に相当する)を含むDNA断片を得た。

他方、サイトメガロウイルスプロモーターの下流にマルチクローニング部位を含む約5.4Kbpの動物細胞発現用ベクターR。/CMV (Invitrogen

(15)

から市販されている)をHind III及びXba Iにより消化し線状化ベクターを得た。この線状化ベクターに前記DNA断片を連結することにより、サイトメガロウイルスの下流のHind III (895) とXba I (986) との間にヒトスカベンジャーcDNA断片が挿入された組換え体プラスミドpXhSR I及びpXhSR IIをアンピシリン耐性選択により得た。この組換え体が大腸菌JM103にトランスフェクトして増幅した後、CsCl超遠心法により精製した。

これらの組換え体を用いてチャイニーズハムスターオリバー(CHO-K1)細胞を形質転換した。すなわち、CHO-K1細胞5×10⁵個/Φ60mmディッシュを、7%ウシ胎児血清(FBS)を含有するF-12 Nutrient Mixture培地(Ham F-12; GIBCO製)中で5%CO₂の雰囲気中37℃にて3日間培養し、80%コンフルエントした。この培養細胞をOpti-MEM1 Reduced Serum Medium(Opti-MEM; GIBCO製)により3回洗浄した。この細胞に、5μgの前記組換え体DNA及び50μgのリポフェクテン試薬(BRL)を含むOpti-MEM培地3mlを加え、細胞を5%CO₂、

(16)

37℃にて19時間培養した。次に、15%FBSを含有するHam F-12培地3mlを加え、さらに一夜培養してトランスフェクションを行った。培養物をトリプシン-EDTA溶液で処理することによりディッシュから回収した。

組換え体の作製に用いたベクターR。/CMVはネオマイシン耐性遺伝子を含有しているため、ネオマイシン耐性細胞を選択することにより形質転換された細胞を選択することができる。前記の細胞1×10⁶個/Φ60mmディッシュを7%FBSを含有するHam F-12培地で6時間培養した後、G418(Geneticin; GIBCO製)を最終濃度470μg/mlとなるように添加し、5%CO₂、37℃にて12日間培養することによりネオマイシン耐性細胞のコロニーを選択した。この培養の間、4日毎に培地を交換した。I型及びII型についてそれぞれ48個ずつのコロニーを選択し、24-ウェル・ディッシュで培養した。

これらの形質転換細胞株からヒトスカベンジャーレセプターの発現量の多い細胞を選択するため、

(17)

(18)

1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチル-インドカルボシアニン・ペルクロレート(Dil)により標識したアセチル化低比重リポ蛋白質(Dil-AcLDL)を用いて細胞へのAcLDLの取込み試験を行った。すなわち、前記のようにして培養した細胞をトリブシン処理することにより回収し、各クローンからの細胞約700個/φ7mmテフロンコーティングスライド(Bokusui Brown製)をネオマイシン400μg/ml含有Ham F-12培地中で一夜培養し、これにDil-AcLDLを最終濃度20μg LDL蛋白質/mlとなるように添加してさらに一夜培養した。この細胞をリン酸緩衝液で洗浄し、細胞へのDilの取込みを蛍光顕微鏡を用いて観察し、最も蛍光強度の強い細胞株を選択した。こうして、ヒトスカベンジャーレセプター発現細胞HSR I-28(I型発現株)及びHSR II-6(II型発現株)を得た。

これらの動物細胞HSR I-28及びHSR II-6はそれぞれ微工研条寄第2837号(PERM BP-2837)及び微工研条寄第2840号(PERM BP-2840)として工業

技術院微生物工業技術研究所に寄託された。

実施例4. 動物細胞よりのスカベンジャー受容体 蛋白の精製

スカベンジャー受容体を発現させたCHO細胞を5% FCS、Ham F12 培地中で大量培養後、ラバーポリスマンにて集め、20mM Tris(HCl pH 8)、1mM CaCl₂、150mM NaCl、1mM PMSF 溶液(溶液A)中でホモジナイズし、100,000 gにて1時間超遠心にて沈殿する膜面物を回収し、これを1% Triton X-100を含む溶液A中で、30分可溶化する。

このTriton X-100 可溶化膜蛋白を、マレイル化BSAアフィニティカラム(T. KodamaらPNAS 85, 9238-9242, 1988)にapply し1M NaCl、20mM Tris-HCl pH 8、1mM CaCl₂、1% Triton X-100を含む溶液中に回収する。更にヒトスカベンジャー受容体に対する抗体を用いた免疫アフィニティカラム法(T. Kodamaら、PNAS, 85, 9238-9242, 1988)により、ほぼ純回品のヒトスカベンジャー受容体をうるることができる。

(19)

(20)

実施例5. 固相化したヒトスカベンジャー受容体 発現細胞及び膜蛋白を用いた血中変性 リポ蛋白及び変性物の検出法

ヒトスカベンジャー受容体を発現した細胞を固相化又は、実施例4にてえた細胞膜蛋白を固相化(T. Kodama PNAS 同上)し、そこに¹²⁵I、又はケイ光(例えばDil)で標識した変性LDL(アセチルLDL又は酸化LDL)を加えると一定のプレートへの結合がみられる。ここへ、種々の検体(例えば血清、培養上清など)を加えることにより標識された変性LDLの結合の抑制をみることにより、血中のスカベンジャー受容体結合物質の量を定量することが可能となる。

4. 図面の簡単な説明

第1図はヒトスカベンジャーレセプターI型をコードする領域を含むcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す。

第2図はヒトスカベンジャーレセプターII型をコードする領域を含むcDNAの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す。

(21)

AGAGAGTGG ATAAATCAGT GCTGCTTCTT TPAGGACGAA AGAAGT
 ATG GAG CAG TGG GAT CAC TTT CAC AAT CAA CAG GAG GAC
 M E Q W D H F H N Q Q E D
 ACT GAT AGC TGC TCC GAA TCT GTG AAA TTT GAT GCT CGC
 T D S C S E S V K F D A R
 TCA ATG ACA GCT TTG CTT CCG AAT CCT AAA AAC AGC
 S M T A L L P P N P K N S
 CCT TCC CTT CAA GAG AAA CTG AAG TCC TTC AAA GCT GCA
 P S L Q E K L K S F K A A
 CTG ATT GCC CTT TAC CTC CTC GTG TTT GCA GTT CTC ATC
 L I A L Y L L V F A V L I
 CCT CTC ATT GGA ATA CTG GCA GCT CAA CTC CTG AAG TGG
 F L I G I V A A Q L L K W
 GAA ACG AAG AAT TGC TCA GTT ACT TCA ACT AAT GCA AAT
 E T K N C S V S S T N A N
 GAT ATA ACT CAA AGT CTC ACG GGA AAA GGA AAT GAC AGC
 D I T Q S L T G K G N D S
 GAA GAG GAA ATG AGA TTT CAA GAA GTC TTT ATG GAA CAC
 E E M R P Q E V F H E H
 ATG AGC AAC ATG GAG AAG AGA ATC CAG CAT ATT TTA GAC
 M S N M E K R I Q H I L D
 ATG GAA GCC AAC CTC ATG GAC ACA GAG CAT TTC CAA AAT
 M E A N L M D T E H F Q N
 TTC AGC ATG ACA ACT GAT CAA AGA TTT AAT GAC ATT CTT
 F S M T T D Q R P N D I L
 CTG CAG CTA AGT ACC TTG TTT TCC TCA GTC CAG GGA CAT
 L Q L S T L P S S V Q Q H
 GGG AAT GCA ATA GAT GAA ATC TCC AAG TCC TTA ATA AGT
 G N A I D E I S K S L I S
 TTG AAT ACC ACA TTG CTT GAT TTG CAG CTC AAC ATA GAA
 L N T T L L D L Q L N I E
 AAT CTG AAT GGC AAA ATC CAA GAG AAT ACC TTC AAA CAA
 N L N G K I Q E N T F K Q
 CAA GAG GAA ATC AGT AAA TTA GAG GAG COT GTT TAC AAT
 Q E E I S K L E E R V Y N

GTA TCA GCA GAA AAT ANG GGT ATG AAA GAA GAA CAA GTG
 V S A E I M A M K E E Q V
 CAT TTG GAA CAG GAA ATA AAA GGA GAA GTG AAA GTA CTG
 H L E Q E I K G E V K V L
 AAT AAC ATC ACT AAT GAT CTC AGA CTG AAA GAT TGG GAA
 N N I T N D L R L K D W E
 CAT TCT CAG ACC TTG AGA AAT ATC ACT TTA ATT CAA GGT
 H S Q T L R N I T L I Q G
 CCT CCT GGA CCC CCG GGT GAA AAA GGA GAT CGA GGT CCC
 P P G P P G E K G D R G P
 ACT GGA GAA AGT GGT CCA CGA GGA TTT CCA GGT CCA ATA
 T G E S G P R Q P P G P I
 GGT CCT CCG GGT CTT AAA GGT GAT CCG GGA GCA ATT GGC
 G P P G L K G D R G A I G
 TTT CCT GGA AGT CGA GGA CTC CCA GGA TAT GGC GGA AGG
 P P G S R G L P G Y A G R
 CCA GGA AAT TCT GGA CCA AAA GGC CAG AAA GGG GAA AAG
 P G N S C P K G Q K G E K
 GGG AGT GGA AAC ACA TTA ACT CCA TTT ACG AAA GTT CGA
 G S G N T L T P F T K V R
 CTG GTC GGT GGG AGC GGC CCT CAC GAG GGG AGA GTG GAG
 L V G G S G C P H E G R V E
 ATA CTC CAC AGC GGC CAG TGG GGT ACA ATT TGT GAC GAT
 I L H S G Q W G T I C D D
 CGC TGG GAA GTG CGC GTT GGA CAG GTC GTC TGT AGG AGC
 R W E V R V G Q V V C R S
 TTG GGA TAC CCA GGT GTT CAA GCC GTG CAC AAG GCA GCT
 L G Y P G V Q A V H K A A
 CAC TTT GGA CAA GGT ACT GGT CCA ATA TGG CTG AAT GAA
 H P G Q G T G P I W L N E
 GTG TTT TGT TTT GGG AGA GAA TCA TCT ATT GAA GAA TGT
 V P C P G R E S S I E E C
 AAA ATT CGG CAA TGG GGG ACA AGA GCC TGT TCA CAT TCT
 K I R Q W G T R A C S H S
 GAA GAT GCT GGA GTC ACT TGC ACT TTA TAA TGCATCATAT
 E D A G V T C T L T E

-1

762

39

234

113

741

78

247

26

780

117

260

39

819

156

273

52

858

195

286

65

897

234

299

78

936

273

312

91

975

312

325

104

1014

351

338

117

1053

390

351

130

1092

429

1131

143

377

468

1170

156

390

507

1209

169

403

546

1248

182

416

585

1287

195

429

624

1326

208

442

663

1365

221

452

第 1 回 (201)

第 1 回 (202)

AGGAGCTGG ATAAATCAGT GCTGCTTCT TTAGGACGAA AGAAGT
 ATG GAG CAG TGG GAT CAC TTT CAC AAT CAA CAG GAG GAC
 M E Q W D H F H N Q Q E D
 39 13
 ACT GAT AGC TGC TCC GAA TGT GTG AAA TTT GAT GCT CGC
 T D S C S E S V K F D A R
 78 26
 TCA ATG ACA GCT TTG CTT CCG AAT CCT AAA AAC AGC
 S M T A L L P P N P K N S
 117 39
 CCT TCC CTT CJA GAG AAA CTG AGG TCC TTC AAA GCT GCA
 P S L Q E K L K S F K A A
 156 52
 CTG ATT GCC CTT TAC CTC CTC GTG TTT GCA GTT CTC ATC
 L I A L Y L L V F A V L I
 195 65
 CCT CTC ATT GGA ATA GTG GCA GCT CAA CTC CTG AAG TCG
 P L I G I V A A Q L L K W
 234 78
 GAA ACG AAG AAT TGC TCA GTT AGT TCA ACT AAT GCA AAT
 E T K H C S V S S T N A N
 273 91
 GAT ATA ACT CAA AGT CTC ACG GGA AAA GGA AAT GAC AGC
 D I T Q S L T G K G N D S
 312 104
 GAA GAG GAA ATG AGA TTT CAA GAA GTC TTT ATG GAA CAC
 E E E M R F Q E V F M E H
 351 117
 ATG AGC AAC ATG GAG AAG AGA ATC CAG CAT ATT TTA GAC
 M S N M E K R I Q H I L D
 390 130
 ATG GAA GCC AAC CTC ATG GAC ACA GAG CAT TTC CAA AAT
 M E A N L M D T E H F Q N
 429 143
 TTC AGC ATG ACA ACT GAT CAA AGA TTT AAT GAC ATT CTT
 F S M T T D Q R F N D I L
 468 156
 CTG CAG CTA AAT ACC TTG TTT TCC TCA GTC CAG GGA CAT
 L Q L S T L F S S V Q G H
 507 169
 GGG AAT GCA ATA GAT GAA ATC TCC AAG TCC TTA ATA AGT
 G N A I D E I S K S L I S
 546 182
 TTG AAT ACC ACA TTG CTT GAT TTG CAG CTC AAC ATA GAA
 L N T T L L D L Q L N I E
 585 195
 AAT CTG AAT GGC AAA ATC CAA GAG AAT ACC TTC AAA CAA
 N L N G K I Q E N T F K Q
 624 208
 CAA GAG GAA ATC AGT AAA TTA GAG GAG GGT TAC AAT
 Q E E I S K L E E R V Y N
 663 221

TTTCATTCAC AACTATGAAA TCGCTGCTCA AAAATGATTT TATFACCTTG
 TTCCGTGAAA ATCCATTAA TCAATATTTA AGAGATTAG AATATGCCCC
 AAAPAAATAT TTAGATTACA GGATTATAT ATGGAACACC TTCAATGCTTA
 CTATTTTATG TCTATATTTA AATCATTTTA ACTTCTATAG GTTTTTAAT
 GGAATTTTCT AATATAATGA CTTATATGCT GAATTGAACA TTTTGAAGTT
 TATAGCTTCC AGATTACAAA GGCCAAGGGT AATAGAAATG CATACCACTA
 ATTGGCTCCA ATTCATAATA TGTTCACCAG GAGATTACAA TTTTGTGCTC
 TTCTGTGCTT TGEAATCTAT TTAGTTGAT TTAATTACTT TCTGAATTAAC
 GGAAGGATC AGAAGATATC TTTGTGCTCT AGATTGCAAA ATCTCCAAATC
 CACACATAT GTTTTAAAT AGCAATGTTA TCCAACTATT AAGATATCTC
 AATGTCAAT AACTGTGTA TTAGATATCA ATGTTAATGA TATGTCTTGG
 CCACTATGGA CCAGGAGCT TATTTTCTT GTCATGTACT GACAACTGTT
 TAAATGAATC ATGAAG

第 2 回 (201)

第 1 回 (203)

GTA TCA GCA GAA ATT ATG GCT ATG AAA GAA GAA CAA GTG	702
V S A E I M A M K E E Q V	234
CAT TTG GAA CAG GAA ATA AAA GGA GAA GTG AAA GTA CTG	741
H L E Q E I K G E V K V L	247
AAT AAC ATC ACT AAT GAT CTC AGA CTG AAA GAT TGG GAA	780
N N I T N D L R L K D W E	260
CAT TCT CAG ACC TTG AGA AAT ATC ACT TTA ATT CAA GGT	819
H S Q T L R N I T L I Q G	273
CCT CCT GGA CCC CCG GGT GAA AAA GGA GAT CGA GGT CCC	858
P P G P P G E K G D R G P	286
ACT GGA GAA AGT GGT CCA CGA GGA TTT CCA GGT CCA ATA	897
T G E S G P R G P P G P I	299
GGT CCT CCG GGT CTT AAA GGT GAT CGG GGA GCA ATT GGC	936
G P P G L K G D R G A I G	312
TTT CCT GGA AGT CGA GGA CTC CCA GGA TAT GCC GGA AGG	975
P P G S R G L P G Y A G R	325
CCA GGA AAT TCT GGA CCA AAA GGC CAG AAA GGG GAA AAG	1014
P G N S G P K G Q K G E K	338
GGG AGT GGA AAC ACA TTA AGA CCA GTA CAA CTC ACT GAT	1053
G S G N T L R P V Q L T D	357
CAT ATT AGG GCA GGG CCC TCT TAA GATCAGGTGG GTTGGGCGGG	1097
H I R A G P S Tsr	359
ACATCCTCTG CTACCATCTC ATTAAAAGGC CCTTCACCTC TGGACAAGTC	1147
ATCTGCAACA ACTGACTTCC AAGATCCTTT TGTGACTCCT CCAAATGACT	1197
TTGGTTCCCG TGTGTACCT GACTTCCACA TGGCCTTCTC TCCTGGTCCC	1247
TGGTGCTGTT TGGGCCTCTG CTCCCATGCT CATACCTCTT CTTACTCCAA	1297
TTAC	1301

第 2 図 (その2)